



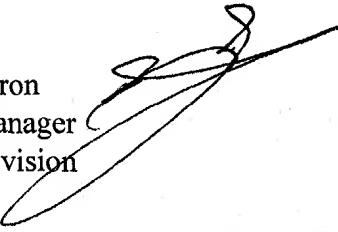
**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**  
**Patent and Trademark Office**  
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER  
OF PATENTS AND TRADEMARKS  
Washington, D.C. 20231

February 20, 1998

MEMORANDUM FOR: PCT Division

FROM: Frank Lebron  
Project Manager  
Refund Division

Subject: REQUEST FOR FILES



The Refund Section is forwarding refund request letter(s) for your immediate review. Referring to RAM, it was determined that these applications are in your area as of 2/20/98. If you have questions , please contact the **Refund Department** in the Office of Finance at 305-4229.

<u>Case Number</u>	<u>Location</u>
08/983605	5610

103 Rec'd PCT/PTO 20 FEB 1998

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 96/01185



REC'D 06 AUG 1996  
WIPO PCT

**Bescheinigung**

**PRIORITY DOCUMENT**

Das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mikrosatellitenmarker für Pflanzen der Spezies Triticum aestivum sowie des Tribus Triticeae und ihre Verwendung"

am 28. Juni 1995 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 H, C 12 P und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 25. Juli 1996

Der Präsident des Deutschen Patentamts

IM Auftrag

Aktenzeichen: 195 25 284.5

Agurks

~~Belegexemplar  
Darf nicht geändert werden~~

Anmelder: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung

Erfinder: Dr. M. Röder, Dr. J. Plaschke, Dr. M. Ganal



## **Mikrosatellitenmarker für Pflanzen der Spezies *Triticum aestivum* sowie des Tribus Triticeae und ihre Verwendung**

### **Zusammenfassung**

Die Erfahrung betrifft neuartige genetische Marker für Weizen (*Triticum aestivum* L.) und nahe verwandte Spezies (Tribus: Triticeae) sowie ihre Verwendung.

Die Aufgabe der Erfahrung besteht darin, neue Mikrosatellitenmarker zur genetischen Analyse von Pflanzen der Spezies *Triticum aestivum* bereitzustellen, die sich durch einen höheren Grad an DNS-Polymorphismus auszeichnen als andere bisher für das Weizengenom entwickelte molekulare Sonden.

Erfahrungsgemäß werden mehr als 100 Mikrosatellitenmarker, bzw. eine Anzahl davon, bereitgestellt, welche als Primerpaare mit zugeordneten Mikrosatellitensequenzen definiert sind und welche Loci von verschiedenen Chromosomen des Weizengenoms amplifizieren und daher zur Genmarkierung geeignet sind.

## Mikrosatellitenmarker für Pflanzen der Spezies *Triticum aestivum* sowie des Tribus Triticeae und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft neuartige genetische Marker für Weizen (*Triticum aestivum* L.) und nahe verwandte Spezies (Tribus Triticeae) sowie ihre Verwendung.

Die am weitesten verbreiteten bekannten genetischen Marker auf DNS-Basis sind die sogenannten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)-Marker. Zur Anwendung dieser Marker wird genomische DNS mit Restriktionsenzymen verdaut, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert (Southernblot). Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNS-Sonden werden spezifische Fragmente detektiert. Beim Auftreten von Mutationen im Bereich der verwendeten Restriktionsenzyme oder kleineren Deletionen/Insertionen werden Polymorphismen zwischen verschiedenen Linien gefunden, welche stabil und meist kodominant vererbt werden. Die Verwendung von RFLP-Markern in hexaploiden Kulturweizen ist nur beschränkt möglich, da auf diese Weise in Weizen nur sehr wenig Polymorphismus detektiert wird.

Es wurde bereits beschrieben, daß Mikrosatellitenmarker zwischen verschiedenen Weizenlinien signifikant mehr Polymorphismus detektieren als RFLP-Marker. Dies ist vor allem auf das Auftreten multipler Allele je Locus zurückzuführen (Röder et al., Mol Genet (1995) 246, 327-333). Daneben ist bekannt, daß Mikrosatellitenmarker den Vorteil haben, daß sie über PCR detektiert werden und daher leichter große Mengen an Proben analysiert werden können.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Mikrosatellitenmarker zur genetischen Analyse von Pflanzen der Spezies *Triticum aestivum* bereitzustellen, die sich durch einen höheren Grad an DNS-Polymorphismus auszeichnen als andere bisher für das Weizengenom entwickelte molekulare Sonden.

Die Aufgabe wird gemäß der Ansprüche 1 bis 10 realisiert. Die erfindungsgemäßen Marker basieren auf der Amplifikation bestimmter hypervariable Genomabschnitte, den sogenannten Mikrosatelliten, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur spezifischen Amplifikation werden für jeden Mikrosatelliten-Locus zwei Primer, jeweils links und rechts in den flankierenden Sequenzen benötigt. Diese Primer sind im Durchschnitt  $20 \pm 3$  Basen lang und durch ihre Sequenzen definiert. Ein Mikrosatellitenmarker ist im Prinzip eine sequence tagged site (STS), welche durch zwei spezifische Primer definiert ist. Diese Primer flankieren, jeweils links und rechts, eine sogenannte Mikrosatellitensequenz. Eine Mikrosatellitensequenz ist definiert als tandemrepetitive Wiederholung einer Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenz, beispielsweise  $(GA)_n$ , wobei  $n > 10$ . Es treten auch zusammengesetzte Mikrosatellitensequenzen auf, beispielsweise  $(GT)_n(AT)_n$ , sowie imperfekte Sequenzen, bei welchen einzelne Basen mutiert sind, beispielsweise  $(GA)_nCA(GA)_n$ . Zwischen verschiedenen Linien und Sorten kommt es zu Variationen der Anzahl der Repeats an einem bestimmten Locus. Dies führt nach Amplifikation des Mikrosatelliten mittels der spezifischen Primer in den flankierenden Sequenzen zu PCR-Produkten verschiedener Länge und damit zu Polymorphismen. Diese Polymorphismen werden stabil vererbt und können daher als genetische Marker verwendet werden. In manchen Fällen treten auch Nullallele (kein sichtbares Fragment) auf, wenn Mutationen innerhalb der Bindungsstelle für die Primer vorhanden sind.

Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen PCR-Produkte kann mit verschiedenen technischen Varianten durchgeführt werden. Für die Auftrennung der Fragmente können hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele (= Sequenzergele) verwendet werden. Die Detektion der Fragmente kann je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung oder bei radioaktiver Markierung der PCR-Fragmente über Autoradiographie erfolgen. Eine weitere sehr effektive Variante der Auftrennung und Detektion besteht im Einsatz eines automatischen Sequenzergerätes mit farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierten Primern. Hierzu ist erforderlich, einen Primer aus jedem Mikrosatelliten-Primerpaar farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkiert zu synthetisieren. Aus der PCR-Amplifikation resultiert ein markiertes Produkt, welches von dem Sequenzergerät detektiert werden kann. Dabei werden für jede

Probe farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierte Größenstandards in derselben Spur mit aufgetrennt. Eine spezielle Software erlaubt es danach, die absolute Größe jedes aufgetrennten Fragmentes zu berechnen und somit auch Fragmente zwischen verschiedenen Gelläufen zu vergleichen. Mit dieser Methode können pro Tag mehrere hundert Proben weitgehend automatisch analysiert werden.

Erfnungsgemäß werden Mikrosatellitenmarker bereitgestellt, die folgende Primerpaare mit zugeordneten Mikrosatellitensequenzen bzw. eine Anzahl davon enthalten und die Loci von allen Chromosomen des Weizengenoms amplifizieren und daher zur Genmarkierung Verwendung finden.

WMS-Nummer	WMS Primer links	WMS Primer rechts	Länge (bp) in 'CS' <sup>a</sup>	Repeat-Typ	Annealing- Temperatur
WMS52	5' CTA TGA GGC GGA GGT TGA AG 3'	5' TGC GGT GCT CTT CCA TTT 3'	150	GTrimp	60 °C
WMS55	5' GCA TCT GGT ACA CTA GCT GCC 3'	5' TCA TGG ATG CAT CAC ATC CT 3'	127	CTimp	60 °C
WMS57	5' TCG ATT CTG AAA GGT TCA TCG 3'	5' CGA TCA AGT AGT TGA AAG CGC 3'	224	AAAAimp	60 °C
WMS58	5' TCT GAT CCC GTG AGT GTA ACA 3'	5' GAA AAA AAT TGC ATA TGA GCC C 3'	118	CA	60 °C
WMS60	5' TGT CCT ACA CGG ACC ACG T 3'	5' GCA TTG ACA GAT GCA CAC G 3'	211	CA	60 °C
WMS63	5' TCG ACC TGA TCG CCC CTA 3'	5' CGC CCT GGG TGA TGA ATA GT 3'	271	GAA,CA,TA	60 °C
WMS67	5' ACC ACA CAA ACA AGG TAA GCG 3'	5' CAA CCC TCT TAA TTT TGT TGG G 3'	85	CA	60 °C
WMS68	5' AGG CCA GAA TCT GGG AAT G 3'	5' CTC CCT AGA TGG GAG AAG GG 3'	182	GA	60 °C
WMS71	5' GGC AGA GCA GCG AGA CTC 3'	5' CAA GTG GAG CAT TAG GTA CAC G 3'	128	GT	60 °C
WMS77	5' ACA AAG GTA AGC AGC ACC TG 3'	5' ACC CTC TTG CCC GTG TTG 3'	153	CA,GA	55 °C
WMS82	5' ACG TTA GAA GGT GCA ATG GG 3'	5' AGT GGA TGC ACC GAC TTT G 3'	152	GT,GAimp	60 °C
WMS88	5' CAC TAC AAC TAT GCG CTC GC 3'	5' TCC ATT GGC TTC TCT CTC AA 3'	121	GT	60 °C
WMS95	5' GAT CAA ACA CAC ACC CCT CC 3'	5' AAT GCA AAG TGA AAA ACC CG 3'	121	CA	60 °C
WMS99	5' AAG ATG GAC GTA TGC ATC ACA 3'	5' GCC ATA TTT GAT GAC GCA TA 3'	119	CA	60 °C
WMS102	5' TCT CCC ATC CAA CGC CTC 3'	5' TGT TGG TGG CTT GAC TAT TG 3'	143	CT	60 °C
WMS106	5' CTG TTC TTG CGT GGC ATT AA 3'	5' AAT AAG GAC ACA ATT GGG ATG G 3'	139	GA	60 °C
WMS108	5' CGA CAA TGG GGT CTT AGC AT 3'	5' TGC ACA CTT AAA TTA CAT CCG C 3'	132	GTrimp	60 °C
WMS112	5' CTA AAC ACG ACA GCG GTG G 3'	5' GAT ATG TGA GCA GCG GTC AG 3'	101	CTimp	55 °C
WMS113	5' ATT CGA GGT TAG GAG GAA GAG G 3'	5' GAG GGT CGG CCT ATA AGA CC 3'	148	GT	60 °C
WMS118	5' GAT GTT GCC ACT TGA GCA TG 3'	5' GAT TAG TCA AAT GGA ACA CCC C 3'	110	CA	60 °C
WMS119	5' TGA CTA ACA TCC TTT GTC ACG C 3'	5' CAT GTC TCA ACC ACC CAC AG 3'	181	GTrimp	55 °C
WMS120	5' GAT CGA CCT TCC TCT CTC TC 3'	5' GAT TAT ACT GGT GCC GAA AC 3'	139	CT,CA	55 °C
WMS121	5' TCC TCT ACA AAC AAA CAC AC 3'	5' CTC GCA ACT AGA GGT GTA TG 3'	143	CA	50 °C
WMS122	5' GGG TGG GAG AAA GGA GAT G 3'	5' AAA CCA TCC TCC ATC CTG G 3'	149	CT,CA	60 °C
WMS124	5' GCC ATG GCT ATC ACC CAG 3'	5' ACT GTT CGG TGC AAT TTG AG 3'	213	CT,GTrimp	60 °C
WMS126	5' CAC ACG CTC CAC CAT GAC 3'	5' GTT GAG TTG ATG CGG GAG G 3'	196	CA	60 °C
WMS128	5' AGC ACA TTT TAA CAC AGA TA 3'	5' ATC TGT GAA ATT TTG AAA AC 3'	176	CA	50 °C
WMS129	5' TCA GTG GGC AAG CTA CAC AG 3'	5' AAA ACT TAG TAG CGG CGT 3'	221	GTrimp	55 °C
WMS130	5' AGC TCT GCT TCA CGA GGA AG 3'	5' CTC CTC TTT ATA TCG CGT CCC 3'	113	GT	60 °C

WMS131	5' AAT CCC CAC CGA TTC TTC TC 3'	5' AGT TCG TGG GTC TCT GAT GG 3'	131	CT	60 °C
WMS132	5' TAC CAA ATC GAA ACA CAT CAG G 3'	5' CAT ATC AAG GTC TCC TTC CCC 3'	119	GA,GAA	60 °C
WMS133	5' ATC TAA ACA AGA DGG CGG TG 3'	5' ATC TGT GAC AAC CGG TGA GA 3'	118	CT	60 °C
WMS134	5' CAT GGA ACT TAG ACA GAA TTG 3'	5' CAG TAC TTG GTA CTG AAC AGG 3'	111	CA	60 °C
WMS136	5' GAC AGC ACC TTG CCC TTG G 3'	5' CAT CGG CAA CAT GCT CAT C 3'	296	CT	60 °C
WMS140	5' ATG GAG ATA TTG GGC CTA CAA C 3'	5' CTT GAC TTC AAG GCG TGA CA 3'	251(?)	CT	55 °C
WMS144	5' TTT GCT GTG GTA CGA AAC ATA C 3'	5' ACT CAC AAA TGT CTA ATA AAA C 3'	200	GT	50 °C
WMS146	5' CCA AAA AAA CTG CCT GCA TG 3'	5' CTC TGG CAT TGC TCC TTG G 3'	162	GAimp	60 °C
WMS148	5' GTG AGG CAG CAA GAG AGA AA 3'	5' CAA AGC TTG ACT CAG ACC AAA 3'	163	CA	60 °C
WMS149	5' CAT TGT TTG CTG CCT CTA GGC 3'	5' CTA GCA TGG AAC CTG AAC AAG 3'	161	GA	55 °C
WMS153	5' GAT CTC GTC ACC CGG AAT TC 3'	5' TGG TAG AGA AGG ACG GAG AG 3'	188	GA	60 °C
WMS154	5' TCA CAG AGA GAG AGG GAG GG 3'	5' ATG TGT ACA TGT TGC CTG CA 3'	102	GA	55 °C
WMS155	5' CAA TCA TTT CCC OCT CCC 3'	5' AAT CAT TGG AAA TCC ATA TGC C 3'	141	CT	60 °C
WMS156	5' CCA ACC GTG CTA TTA GTC ATT C 3'	5' CAA TGC AGG CCC TCC TAA C 3'	277	GT	60 °C
WMS157	5' GTC GTC GCG GTA AGC TTG 3'	5' GAG TGA ACA CAC GAG GCT TG 3'	106	CT	60 °C
WMS159	5' GGG CCA ACA CTG GAA CAC 3'	5' GCA GAA GCT TGT TGG TAG GC 3'	192	GT	60 °C
WMS160	5' TTC AAT TCA GTC TTG GCT TGG 3'	5' CTG CAG GAA AAA AAG TAC ACC C 3'	184	GA	60 °C
WMS161	5' GAT CGA GTG ATG GCA GAT GG 3'	5' TGT GAA TTA CTT GGA CGT GG 3'	154	CT	60 °C
WMS162	5' AGT GGA TCG ACA AGG CTC TG 3'	5' AGA AGA AGC AAA GCC TTC CC 3'	208	CA	60 °C
WMS163	5' ACC TCG ACA GAC CTG GTA CG 3'	5' GTC TTT GTC ACC CGA TGG AC 3'	127	CT	55 °C
WMS164	5' ACA TTT CTC CCC CAT CGT C 3'	5' TTG TAA ACA AAT CGC ATG CG 3'	120	CT	55 °C
WMS169	5' ACC ACT GCA GAG AAC ACA TAC G 3'	5' GTG CTC TGC TCT AAG TGT GGG 3'	196	GA	60 °C
WMS174	5' GGG TTC CTA TCT GGT AAA TCC C 3'	5' GAC ACA CAT GTT CCT GCC AC 3'	173	CT	55 °C
WMS179	5' AAG TTG AGT TGA TGC GGG AG 3'	5' CCA TGA CCA GCA TCC ACT C 3'	181	GT	55 °C
WMS180	5' ATC CGC CTA AGG AAT AGT GT 3'	5' GAT CGC ACG GGA GAG AGA G 3'	84	CT	50 °C
WMS181	5' TCA TTG GTA ATG AGG AGA GA 3'	5' GAA CCA TPC ATG TGC ATG TC 3'	135	GA	50 °C
WMS182	5' TGA TGT AGT GAG CCC ATA GGC 3'	5' TTG CAC ACA GGC AAA TAA GG 3'	165	CT	60 °C
WMS186	5' GCA GAG CCT GGT TCA AAA AG 3'	5' CGC CTC TAG OGA GAG CTA TG 5'	140	GA	60 °C
WMS189	5' AGG AGC AGC GGA AGC AAC 3'	5' AGA AAT CGC GAA ACC CAC CC 3'	117	CA	55 °C
WMS190	5' GTG CTT GCT GAG CTA TGA GTC 3'	5' GTG CCA CGT GGT ACC TTT G 3'	>201	CT,GT (?)	60 °C
WMS191	5' AGA CTG TTG TTT GCG GGC 3'	5' TAG CAC GAC AGT TGT ATG CAT G 3'	128	CT	60 °C
WMS192	5' GGT TTT CTT TCA GAT TGC GC 3'	5' CGT TGT CTA ATC TTG CCT TGC 3'	191	CT	60 °C
WMS193	5' CTT TGT GCA CCT CTC TCT CC 3'	5' AAT TGT GTT GAT GAT TTG GGG 3'	171	CT,CA	60 °C
WMS194	5' GAT CTG CTC TAC TCT CCT CC 3'	5' CGA CGC AGA ACT TAA ACA AG 3'	131	CT	50 °C
WMS195	5' AGG TGC CGT CGC GTC TAC 3'	5' ACC CCC CAC GTC AGA GAG 3'	108	CT	60 °C
WMS197	5' GAG AAA GAG GTC TGG AGG TCG 3'	5' CAA AAT GCA CAA GAA TGG AGG 3'	126	CT	60 °C
WMS198	5' TTG AAC CGG AAG GAG TAC AG 3'	5' TCA GTT TAT TTT GGG CAT GTG 3'	130	CA	60 °C
WMS200	5' TCA ACG GAA CAG ATG AGC G 3'	5' GAC CTG ATG AGA GCA AGC AC 3'	250	CT	60 °C
WMS203	5' CCC AAA GCA CGC CAA GC 3'	5' ACC AAT GCT ATC GGC TCG 3'	139	CA,GA	55 °C
WMS205	5' CGA CCC GGT TCA CTT CAG 3'	5' AGT CGC CGT TGT ATA GTG CC 3'	152	CT	60 °C
WMS210	5' TGC ATC AAG AAT AGT GTG GAA G 3'	5' TGA GAG GAA GGC TCA CAC CT 3'	192	GA	60 °C
WMS212	5' AAG CAA CAT TTG CTG CAA TG 3'	5' TGC AGT TAA CTT GTT GAA AGG A 3'	104	CT	60 °C
WMS213	5' TGC CTG GCT CGT TCT ATC TC 3'	5' CTA GCT TAG CAC TGT CGC CC 3'	184	GA	60 °C
WMS218	5' CGG CAA ACG GAT ATC GAC 3'	5' AAC AGT AAC TCT CGC CAT AGC C 3'	149	CT	60 °C
WMS219	5' GAT GAG CGA CAC CTA GCC TC 3'	5' GGG GTC CGA GTC CAC AAC 3'	181	GAimp	60 °C
WMS224	5' TGA GTC CAG CAC TGC TGC 3'	5' CAA CAT CGG CTC GTA TTC AA 3'	142	CT	50 °C
WMS228	5' TCA TAT GCA CCT CTT TCC TAG G 3'	5' GTG TGC CAC CTT TGA CGT C 3'	210	CT,CA	60 °C
WMS231	5' AGC TCG GGA TGA AGC GTG 3'	5' GAT CGG CGG CTG CGT TT 3'	130	GAimp	60 °C
WMS232	5' ATC TCA ACG GCA AGC CG 3'	5' CTG ATG CAA GCA ATC CAC C 3'	141	GA	55 °C
WMS233	5' TCA AAA CAT AAA TGT TCA TTG GA 3'	5' TCA ACC GTG TGT AAT TTT GTC C 3'	261	CT	60 °C
WMS234	5' GAG TCC TGA TGT GAA GCT GTT G 3'	5' CTC ATT GGG GTG TGT ACG TG 3'	241	CT,CA	55 °C
WMS237	5' GAA TCA CTT GTG AAG CAT CTG G 3'	5' CTG GAT GCA TCA CAT CCA AC 3'	137	CT	55 °C
WMS238	5' TCG CTT CTA CGG CTC ACC 3'	5' AGT GCC TTG CGG AGG TC 3'	204	CT,GT,GGGT	55 °C
WMS241	5' TCT TCC AAC TAA AGC ATA GC 3'	5' CTT CCA TGG ACT AC4 TAC TAC C 3'	146	GA	55 °C

WMS244	5' GGC AGC TGA CGC AAT CTG 3'	5' TTT GGA CAT TTC CCA GCG 3'	227	CAimp	60 °C
WMS245	5' CAG CGC AGT TAG CTC GC 3'	5' ATC TGT CCA TTC GAG CGC 3'	141	CT	60 °C
WMS247	5' GCA ATC TTT TTT CTG ACC ACG 3'	5' ATG TGC ATG TCG GAC GC 3'	158	GA	60 °C
WMS248	5' AGG ACT TCC GCA CCC TG 3'	5' TGG OGT GGT CTA AAT GGA C 3'	185	CA	60 °C
WMS249	5' CAA ATG GAT CGA GAA AGG GA 3'	5' CTG CCA TTT TTC TGG ATC TAC C 3'	177	GAimp	60 °C
WMS251	5' CAA CTG GTT CCT ACA CAA GCA 3'	5' GGG ATG TCT GTT CCA TCT TAG 3'	103	CA	55 °C
WMS255	5' CAA CTG TAC GTA GGT TTC ATT GC 3'	5' TCT GCC GTA AGT CGC CTC 3'	148	GA	55 °C
WMS259	5' AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC 3'	5' CGA CGG ACT TOG GGT TC 3'	105	GA	55 °C
WMS260	5' GCC CCC TTG CAC AAA TC 3'	5' CGC AGC TAC AGG AGG CC 3'	157	GA	55 °C
WMS261	5' CTC CCT GTA CGC CTA AGG C 3'	5' CTC CGG CTA CTA GCC ATT G 3'	192	CT	55 °C
WMS263	5' TCT GCC GTA AGT CGC CTC 3'	5' GGT TTC ATT GCT TGC CCT AA 3'	134	CT	55 °C
WMS265	5' TGT TCC GGA TGG TCA CTA TT 3'	5' GAG TAC ACA TTT GGC CTC TGC 3'	200	GT	55 °C
WMS272	5' TGC TCT TTG CGG AAT ATA TGG 3'	5' GTT CAA AAC AAA TTA AAA CGC CC 3'	140	CA	55 °C
WMS273	5' ATT GGA CGG ACA GAT GCT TT 3'	5' AGC AGT GAG GAA GGG GAT C 3'	167	GA	55 °C
WMS274	5' AAC TTG CAA AAC TGT TCT GA 3'	5' TAT TTG AAG CGG TTT GAT TT 3'	179	GT	55 °C
WMS275	5' AAT TTT CCT CCT CAC TTA TTC T 3'	5' AAC AAA AAA TTA GGG CC 3'	107	CT	55 °C
WMS276	5' ATT TGC CTG AAG AAA ATA TT 3'	5' AAT TTC ACT GCA TAC ACA AG 3'	99	CT	55 °C
WMS278	5' GTT GCT TCA TGA ACG CTC AA 3'	5' CTG CCC AAT TTT CTC CAC TC 3'	241	GTempGAimp	55 °C

<sup>a</sup> 'CS' Weizen-Sorte 'Chinese Spring'

Diese Marker zeichnen sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus zwischen verschiedenen Weizensorten bzw. -linien aus und detektieren in der Regel in verschiedenen Weizenlinien mehrere Allele pro genetischen Locus.

Sie sind daher für 'DNA fingerprinting', Sortenidentifikation, Verwandschafts- bzw. Ähnlichkeitsstudien, Charakterisierung von cytologischen Linien wie z. B. Deletionslinien, Substitutionslinien, Additionslinien etc. und allen Formen von genetischen Kartierungen, einschließlich der Kartierung von Einzelgenen und quantitativen Merkmalen (QTLs), verwendbar. Außerdem ist ihr Einsatz sehr gut für eine Automatisierung geeignet und es ist möglich, die Detektion der Produkte mit nichtradioaktiven Methoden durchzuführen.

Mit Hilfe dieser erfundungsgemäßen Marker ist z.B. die Möglichkeit einer Unterscheidung nahezu aller europäischen Weizenlinien gegeben.

5  
Anschließend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

### 1. Amplifikation der Mikrosatellitenmarker

Die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker erfolgt nach folgendem Protokoll:

10 mM Tris-HCl pH 8

50 mM KCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (in wenigen Ausnahmen 3 mM MgCl<sub>2</sub>)

0,01% (w/v) Gelatine

✓ 0,2 mM von jedem Deoxynukleotid

250 nM von jedem Primer (jeweils der linke und der rechte von einem Paar)

1-2 U *Taq*-Polymerase

50-150 ng Matrizen (template) DNS

werden in einem Volumen von 25 oder 50 µl nach folgendem Profil amplifiziert:

92 °C 3 min.

60 °C 1 min. (Annealing-Phase)

72 °C 2 min (Elongationsphase) 45 Zyklen

92 °C 1 min (Denaturierungsphase)

72 °C 10 min (Extensionsphase)

Die Amplifikation erfolgt in einem Perkin Elmer 9600 mit Deckelheizung oder in einem MJ Research Thermocycler ohne Deckelheizung. In diesem Gerät werden die Reaktionen mit Mineralöl überschichtet. Die Temperatur der Annealingphase

richtet sich nach dem Schmelzpunkt ( $T_m$ ) der Primer und beträgt in manchen Fällen auch 50 °C oder 55 °C.

## 2. Auftrennung der Mikrosatellitenmarker auf nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen

Die PCR-Reaktionen werden mit 1/10 Vol. Stop-Puffer (0,02 M Tris-Acetat pH 8,1, 0,025 M Natrium-Acetat, 0,02 M EDTA, 70 % Glycerin, 0,2 % SDS, 0,6 % Bromphenolblau, 0,6 % Xylencyanol) versetzt und jeweils 25 µl werden in 10 %igen Polyacrylamidgelen (1,5 mm dick, 18 cm lang) aufgetrennt.

Ansatz für 1 Polyacrylamidge (10%):

25 ml Acrylamidstammlösung (19 g Acrylamid, 1 g Bisacrylamid, auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O)

10 ml 5X TBE (1X TBE = 0,09 M Tris-Borat pH 8,3, 0,002 M EDTA)

15 ml H<sub>2</sub>O

werden gemischt und die Polymerisierung durch Zugabe von 220 µl Ammoniumpersulfat (10 %, frisch angesetzt) und 20 µl TEMED gestartet. Sofort nach Zugabe wird das Gemisch in die abgedichtete Gelform gegossen und der Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Nach ca. 1 h ist die Polymerisierung abgeschlossen. Das Gel wird in die Gelkammer eingesetzt und es erfolgt ein Vorlauf ohne Proben für circa 30 min. bei 150 Volt in 1X TBE. Danach werden die Proben geladen (je 25 µl) und bei 100 Volt 14-16 h lang aufgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für circa 20 min. in Ethidiumbromid (1-2 Tropfen 10 mg/ml in 1 l H<sub>2</sub>O) gefärbt und die Fragmente durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

### 3. Auf trennung der Mikrosatellitenmarker auf denaturierenden Gelen

Zur Auf trennung der amplifizierten Fragmente auf denaturierenden Gelen wird beispielsweise ein Automatischer Laser Fluorescence (A.L.F.) Sequencer (Pharmacia) genutzt. Um die Detektion der Fragmente mittels Laser zu ermöglichen wird ein Primer je Paar am 5' Ende fluorescein-markiert. Je 0,3 bis 1,5 Mikroliter pro PCR-Reaktion werden mit 2,5 Mikrolitern Stop-Puffer (deionisiertes Formamid; 5 mg/ml Dextran Blue) versetzt, denaturiert (1 min; 90°C) und auf das Gel geladen. Es werden Gelplatten mit 9 cm Auf trennungs distanz genutzt, wie vom Hersteller für die Fragmentanalyse empfohlen. Die Gellösung beinhaltet 6,5 % Long-Ranger (AT Biochem), 7M Harnstoff und 1,2X TBE-Puffer. Die Gele sind 0,35 oder 0,5 mm stark. Die Konditionen für den Gellauf sind 600 V, 40 mA, 50 W, 0,84 s Datensammlungs-Intervall und 2 mW Laser-Energie. Die Gelläufe werden nach ca. 80-90 min beendet, was für eine Detektion von Fragmenten bis zu 300 bp Größe ausreicht. Ein Gel kann für vier bis fünf Läufe verwendet werden. Für jeden Gellauf wird eine Datendatei erhalten. Mit dieser Datei und anhand interner Größenstandards werden im Computer-Programm Fragment-Manager (Pharmacia) die genauen Fragmentgrößen ermittelt, und somit kleinste Größenunterschiede von einem Basenpaar bestimmt.

- 14
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auf trennung der Marker hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele verwendet werden.
  8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung, bei radioaktiver Markierung über Autoradiographie oder mittels automatischem Sequenziergerät unter Verwendung farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierter Primer erfolgt.
  9. Verwendung der Mikrosatellitenmarker nach Anspruch 1-7 zur genetischen Analyse hexaploider und tetraploider Kulturformen des Weizens.
  10. Verwendung nach Anspruch 8 zur genetischen Kartierung und Markierung von monogenen und polygenen Eigenschaften und deren Selektion, zur Verwandtschaftsanalyse und Sortenidentifikation sowie zur Evaluierung von Sortenreinheit, Hybrididentifikation und Pflanzenzüchtung.

WMS197	5' GAG AAA GAG GTC TGG AGG TCG 3'	5' CAA AAT GCA CAA GAA TGG AGG 3'	CT
WMS198	5' TTG AAC CGG AAG GAG TAC AG 3'	5' TCA GTT TAT TTT GGG CAT GTG 3'	CA
WMS200	5' TCA ACG GAA CAG ATG AGC G 3'	5' GAC CTG ATG AGA GCA AGC AC 3'	CT
WMS203	5' CCC AAA GCA CGG CAA GC 3'	5' ACC AAT GCT ATC GCC TCG 3'	CA,GA
WMS205	5' CGA CCC CGT TCA CTT CAG 3'	5' AGT CGC CGT TGT ATA GTG CC 3'	CT
WMS210	5' TGC ATC AAG AAT AGT GTG GAA G 3'	5' TGA GAG GAA GGC TCA CAC CT 3'	GA
WMS212	5' AAG CAA CAT TTG CTG CAA TG 3'	5' TGC AGT TAA CCT GTT GAA AGG A 3'	CT
WMS213	5' TGC CTG GCT CGT TCT ATC TC 3'	5' CTA GCT TAG CAC TGT CGC CC 3'	GA
WMS218	5' CGG CAA ACG GAT ATC GAC 3'	5' AAC AGT AAC TCT CGC CAT AGC C 3'	CT
WMS219	5' GAT GAG CGA CAC CTA GCC TC 3'	5' GGG GTC CGA GTC CAC AAC 3'	GAimp
WMS224	5' TGA GTC CAG CAC TGC TGC 3'	5' CAA CAT CGG CTC GTA TTC AA 3'	CT
WMS228	5' TCA TAT GCA CCT CTT TCC TAG G 3'	5' GTG TGC CAC CCT TGA CGT C 3'	CT,CA
WMS231	5' AGC TCG GGA TGA AGC GTG 3'	5' GAT CGG CGG CTG CGT TT 3'	GAimp
WMS232	5' ATC TCA ACG GCA AGC CG 3'	5' CTG ATG CAA GCA ATC CAC C 3'	GA
WMS233	5' TCA AAA CAT AAA TGT TCA TTG GA 3'	5' TCA ACC GTG TGT ATT TTT GTC C 3'	CT
WMS234	5' GAG TCC TGA TGT GAA GCT GTT G 3'	5' CTC ATT GGG GTG TGT ACG TG 3'	CT,CA
WMS237	5' GAA TCA CCT GTG AAC CAT CTG G 3'	5' CTG GAT GCA TCA CAT CCA AC 3'	CT
WMS238	5' TCG CCT CTA CGG CTC ACC 3'	5' AGT GCC TTG CGG AGG TC 3'	CT,GT,GGGT
WMS241	5' TCT TCC AAC TAA AGC ATA GC 3'	5' CCT CCA TGG ACT ACA TAC TAG C 3'	GA
WMS244	5' GGC AGC TGA GGC AAT CTG 3'	5' TTT GGA CAT TTC CCA GCG 3'	CAimp
WMS245	5' CAG CGC AGT TAG CTC GC 3'	5' ATC TGT CCA TTC GAG CGC 3'	CT
WMS247	5' GCA ATC TTT TTT CTG ACC ACG 3'	5' ATG TGC ATG TCG GAC GC 3'	GA
WMS248	5' AGG ACT TCC GCA CCC TG 3'	5' TGG CGT GGT CTA AAT GGA C 3'	CA
WMS249	5' CAA ATG GAT CGA GAA AGG GA 3'	5' CTG CCA TTT TTC TGG ATC TAC C 3'	GAimp
WMS251	5' CAA CTG GTT GCT ACA CAA GCA 3'	5' GGG ATG TCT GTT CCA TCT TAG 3'	CA
WMS255	5' CAA CTG TAC GTA GGT TTC ATT GC 3'	5' TCT GCC GTA AGT CGC CTC 3'	GA
WMS259	5' AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC 3'	5' CGA CGG ACT TCG GGT TC 3'	GA
WMS260	5' GCC CCC TTG CAC AAA TC 3'	5' CGC AGC TAC AGG AGG CC3'	GA
WMS261	5' CTC CCT GTA CGC CTA AGG C 3'	5' CTC GCG CTA CTA GCG ATT G 3'	CT
WMS263	5' TCT GCC GTA AGT CGC CTC 3'	5' GGT TTC ATT GCT TGC CCT AA 3'	CT
WMS265	5' TGT TGC CGA TGG TCA CTA TT 3'	5' GAG TAC ACA TTT GGC CTC TGC 3'	GT
WMS272	5' TGC TCT TTG CGG AAT ATA TGG 3'	5' GTT CAA AAC AAA TTA AAA GGC CC3'	CA
WMS273	5' ATT GGA CGG ACA GAT GCT TT 3'	5' AGC AGT GAG GAA GGG GAT C 3'	GA
WMS274	5' AAC TTG CAA AAC TGT TCT GA 3'	5' TAT TTG AAG CGG TTT GAT TT 3'	GT
WMS275	5' AAT TTT CCT CCT CAC TTA TTG T 3'	5' AAC AAA AAA TTA GGG CC 3'	CT
WMS276	5' ATT TGC CTG AAG AAA ATA TT 3'	5' AAT TTC ACT GCA TAC ACA AG 3'	CT
WMS278	5' GTT GCT TCA TGA ACG CTC AA 3'	5' CTG CCC AAT TTT CTC CAC TC 3'	GTimeGAimp

6. Verfahren zur Herstellung eines Mikrosatellitenmarkers gemäß Anspruch 1-5 für Pflanzen der Spezies *Triticum aestivum*, sowie des Tribus *Triticeae*, dadurch gekennzeichnet, daß hypervariable Genomabschnitte (sogenannte Mikrosatelliten) mit Hilfe der Polymerasenkettreaktion (PCR) zu polymorphen Fragmenten in Gegenwart zweier spezifischer Primer, die links und rechts für jeden Mikrosatelliten-Locus eine Mikrosatellitensequenz flankieren, amplifiziert, anschließend aufgetrennt und detektiert werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auftrennung der Marker hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele verwendet werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung, bei radioaktiver Markierung über Autoradiographie oder mittels automatischem Sequenziergerät unter Verwendung farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierter Primer erfolgt.
9. Verwendung der Mikrosatellitenmarker nach Anspruch 1-7 zur genetischen Analyse hexaploider und tetraploider Kulturformen des Weizens.
10. Verwendung nach Anspruch 8 zur genetischen Kartierung und Markierung von monogenen und polygenen Eigenschaften und deren Selektion, zur Verwandtschaftsanalyse und Sortenidentifikation sowie zur Evaluierung von Sortenreinheit, Hybrididentifikation und Pflanzenzüchtung.